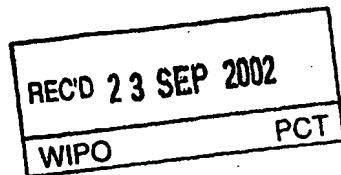


10/324424

PCT/EP 02/08752

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 41 099.9

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Anmeldetag:

22. August 2001

Anmelder/Inhaber:

Supramol Parenteral Colloids GmbH,
Rosbach/DE

Erstanmelder: Dr. Klaus Sommermeyer,
Rosbach/DE

Bezeichnung:

Hyperverzweigtes Amylopektin als Plasma-
volumenexpander

IPC:

C 08 B 37/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

BEST AVAILABLE COPY

München, den 23. Juli 2002

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wahlmeyer

Zusammenfassung

1. Hyperverzweigtes Amylopektin und dessen Derivate als Plasmavolumenexpander

2.1 Plasmaexpander auf Basis von hydroxyethyliertem Amylopektin weisen, bedingt durch die Hydroxyethylierung, bislang noch den Nachteil der nicht vollständigen Metabolisierbarkeit und damit vorübergehender Gewebespeicherung, die mit Nebenwirkungen verbunden ist, auf. Es sollen neue Plasmaexpander auf Basis von Polysacchariden gefunden werden, die diesen Nachteil nicht aufweisen.

2.2 Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß native Pflanzen-Amylopektine durch Transglycosilierung so verändert werden, daß der einstellbare, hohe Verzweigungsgrad eine Steuerung des Serum- α -Amylaseabbaus ermöglicht, so daß keine oder nur sehr geringfügige Hydroxyethylierung notwendig ist.

2.3 Verbesserte, vollständig metabolisierbare Plasmaexpander auf Basis von hyperverzweigtem Amylopektin

Hyperverzweigtes Amylopektin als Plasmavolumenexpander

Die vorliegende Erfindung betrifft den Einsatz von hyperverzweigtem Amylopektin als Plasmavolumenexpander.

In der Geschichte der Entwicklung der Plasmavolumenexpander war es immer ein Ziel, die globuläre Struktur des natürlichen Trägers des kolloidosmotischen Druckes im Serum, des Albumins, zu erreichen. Dieser globulären Struktur kommt das Glycogen, welches ebenfalls als natürliches Speicherpolysaccharid im menschlichen Organismus vorkommt, nahe. Seine globuläre Struktur erreicht das Glycogen durch seinen sehr hohen Verzweigungsgrad. Strukturell stellt das Glycogen ein Glucosepolysaccharid dar mit in linearen Abschnitten α -1,4 glycosidischen Bindungen an denen α -1,6 glycosidische Verzweigungspunkte fixiert sind. Weil Glycogen selbst nicht als eine billige Rohstoffquelle zur Verfügung steht, schlug Wiedersheim 1957 vor, an dessen Stelle das geringer verzweigte Amylopektin als Ausgangsmaterial zur Herstellung des Plasmaexpanders Hydroxyethylstärke einzusetzen. Mittlerweile wird Hydroxyethylstärke in mehreren verschiedenen Typen sehr breit als Plasmaexpander eingesetzt. Die Entwicklung hat zu neuen Hydroxyethylstärke-Typen geführt, die einen optimalen Volumeneffekt aufweisen bei sonst minimalen Nebenwirkungen wie z. B. Beeinflussung der Gerinnung oder aber auch intermediäre Speicherung im Gewebe.

Die verschiedenen im Markt befindlichen HES-Typen unterschieden sich im Bezug auf Molekulargewicht, mittleren Substitutionsgrad und Substitutionsmuster.

Trotz des beachtlichen Fortschritts, der mit diesen Entwicklungen erreicht wurde, verbleiben einige Nachteile auch bei den in den letzten Jahren optimierten HES-Typen, vor allem die nicht vollständige Metabolisierbarkeit.

Es ist bekannt, daß die Hydroxyethyl-Ethergruppe chemisch aber auch metabolisch außerordentlich stabil ist, so daß diejenigen Anhydroglucose-Einheiten der Hydroxyethylstärke, die Hydroxyethyl-Ethergruppen tragen, praktisch nicht metabolisierbar sind. Weiterhin ist bekannt, daß nur diejenigen α -1,4 glycosidischen Bindungen im Hydroxyethylstärkemolekül durch die Serum- α -Amylase gespalten werden können, die durch

nichtsubstituierte Glucoseeinheiten gebildet werden. Aus diesem Grunde ist festzustellen, daß selbst bei den optimierten HES-Typen eine minimale aber immer noch bemerkenswerte Gewebespeicherung zumindest über gewisse Zeiträume festgestellt werden kann.

Als weiterer Nachteil ist festzustellen, daß HES nicht die ideale globulare Struktur des Albumins aufweist und deshalb seine Grenzviskosität bedeutend höher ist als die von Albumin. Eine niedrigere Viskosität ist bei einem Plasmaexpander deshalb wünschenswert, weil nach dessen Applikation in die Zirkulation die Gesamtblutviskosität im Sinne einer Erniedrigung beeinflußt werden würde.

Es bestand daher die Aufgabe, neue verbesserte Plasmaexpander auf Amylopektinbasis zu entwickeln, die die Nachteile der fehlenden vollständigen Metabolisierbarkeit des Amylopektinderivates Hydroxyethylstärke nicht aufweisen. Gleichzeitig sollte der neue Plasmaexpander eine mehr globuläre Struktur aufweisen und damit relativ niedrigviskose Lösungen bilden.

Wir haben festgestellt, daß die Restfraktionen von Hydroxyethylstärke im Blutstrom und im Urin einige Stunden oder sogar Tage nach Applikation eines Plasma-expanders eine starke Zunahme des Verzweigungsgrades aufwiesen im Vergleich zur original infundierten Hydroxyethylstärke. So stiegen die Verzweigungsgrade, ausgedrückt als mol-% der Anhydroglucosen, die Verzweigungspunkte tragen von ca. 5 mol-% auf über 7 mol-% 2 Stunden nach Applikation und auf 8 mol-% 7 Stunden nach Applikation an. Gleichzeitig zeigte sich 48 bzw. 42 Stunden nach Infusion in den Urin-Sammelfraktionen ein noch höherer Verzweigungsgrad von 9 bzw. 10 mol-%. Dieses Phänomen wurde beobachtet unabhängig von Molekulargewicht, Substitutionsgrad oder Substitutionsmuster der applizierten Hydroxyethylstärke. Das bedeutet, daß diese Fraktionen sich beim Abbau immer mehr einer Glycogen-ähnlichen Struktur bzw. Verzweigung nähern, die in der Literatur mit ca. 10 mol-% Verzweigung angegeben wird.

Überraschender Weise haben wir nun festgestellt, daß die relative Stabilität der α -1,6 Verzweigung in Amylopektin bzw. HES ausgenutzt werden kann, um den Abbau von Amylopektin gegenüber dem dominierenden α -Amylase-Abbau soweit zu reduzieren, daß ein vollständig abbaubares Polysaccharid hergestellt werden kann, das aber immer noch die Eigenschaften eines idealen Plasmaexpanders im Bezug auf Pharmakokinetik bzw. Volumeneffekt aufweist. Die Plasmaexpander gemäß vorliegender Erfindung sind hypervverzweigte Amylopektine deren Verzweigungsgrad bzw. deren Verteilung der Verzweigungspunkte so eingestellt sind, daß eine gewünschte Pharmakokinetik bzw. α -Amylase-Abbau erreicht wird.

Solche hypervverzweigte Amylopektine weisen signifikant höhere Verzweigungsgrade, ausgedrückt als mol-% der Verzweigungsanhydroglucosen, auf im Vergleich zu unverändertem Amylopektin bzw. Hydroxyethylstärke und sind demzufolge in ihrer Struktur Glycogen-ähnlicher. Aufgrund des hohen Verzweigungsgrades erfolgt der Angriff der α -Amylase stark verzögert bzw. in Bereichen des Moleküls mit einer starken Dichte an Verzweigungspunkten gar nicht mehr, da dort der Zutritt der α -Amylase nicht mehr möglich ist. Solche Verbindungen sind dennoch abbaubar durch andere Enzyme bis herab zu Oligosacchariden und schließlich Glucose.

Im Bedarfsfalle können solche hypervverzweigten Amylopektine dennoch hydroxyethyliert werden. Der Hydroxyethylierungsgrad ist jedoch in diesen Fällen erheblich niedriger, um einen vergleichbaren Volumeneffekt bzw. Pharmakokinetik aufzuweisen zu einer Hydroxyethylstärke, die aus normal verzweigtem Amylopektin hergestellt worden ist.

Die Herstellung von hypervverzweigtem Amylopektin, welches zum Einsatz als Plasmaexpander geeignet ist, erfolgt in an sich bekannter Weise durch enzymatische Umwandlung durch sogenannte Verzweigungsenzyme, die die Hydrolyse der α -1,4-glycosidischen Bindungen und ihre Transformation in α -1,6-glycosidische Verbindungen katalysieren. Solche sogenannten Transfer-Enzyme können in an sich bekannter Weise z. B. aus Algen extrahiert werden gemäß PCT WO 0018893. Es sind aber auch aus dem US-Patent 4454 161 und EP 0418 945 andere Glycogen-Verzweigungsenzyme bekannt, die ebenfalls

entsprechend eingesetzt werden können. Die Durchführung der enzymatischen Transglycosylierung erfolgt in an sich bekannter Weise durch Inkubation von Wachsmaisstärke mit den entsprechenden Enzymen unter schonenden Bedingungen bei pH-Werten um ca. 7,5 und Temperaturen bei ca. 30 °C in wässriger Lösung. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes erfolgt anschließend in ebenfalls bekannter Weise, wobei zuvor durch pH-Wert Veränderung bzw. Filtrationsschritte die Enzyme deaktiviert oder entfernt werden.

In einem anschließenden Hydrolyseschritt, der vorzugsweise durch Salzsäure erfolgt, wird dann das gewünschte Molekulargewicht des Produktes eingestellt. Anschließend wird das Produkt durch Diafiltration mit Membranen mit einem cut off von ca. 3.000 Dalton von niedermolekularen Verbindungen sowie Kochsalz, welches bei der Neutralisation des sauren Hydrolyseansatzes entsteht, befreit. Das Produkt wird durch Sprühtrocknung isoliert.

Beispiel 1

Herstellung von hypervverzweigtem Amylopektin-Plasmaexpander

Wachsmaisstärke mit einem Gehalt an Amylopektin von über 95 % wird in heißem Wasser bei pH 7,5, welcher zuvor mit Natronlauge eingestellt wurde, verkleistert zu einer 1 %-igen Lösung und der Ansatz anschließend auf ca. 30 °C abgekühlt. Es erfolgt die Zugabe von Verzweigungsenzym, wobei die Aktivität dem gewünschten Verzweigungsgrad angepaßt wird. Nach ca. 6 – 8 Stunden erfolgt Zugabe von Salzsäure zur Einstellung des pH-Wertes von ca. 4. Der Ansatz wird auf ca. 50 °C erhitzt und die Enzyme über Tiefenfilter über Aktivkohleschichten entfernt. Anschließend wird der filtrierte Ansatz mit Salzsäure auf ca. pH 2 eingestellt und nach Erhitzen auf ca. 75 °C eine Säurehydrolyse durchgeführt zur Einstellung des gewünschten Molekulargewichts.

Nach Neutralisation des Ansatzes auf ca. pH 5 – 6 wird der Ansatz nach Tiefenfiltration bei ca. 50°C diafiltriert mit Hohlfasermembranen des nominellen cut offs von 3.000 Dalton. Dabei werden niedermolekulare Anteile sowie Kochsalz und Oligosaccharide sowie Glucose abgetrennt. Anschließend erfolgt Sprühtrocknung. Es resultiert ein weißes Pulver mit einem Wassergehalt von 3 – 5 %.

Patentansprüche

1. **Hyperverzweigtes Amylopektin und dessen Derivate als Plasmaexpander.**
2. **Hyperverzweigte Amylopektin-Derivate als Plasmaexpander gemäß Anspruch 1, wobei die Derivate Hydroxyethyl, Hydroxypropyl und Acetyl-Amylopektin sind.**
3. **Hyperverzweigtes Hydroxyethyl-Amylopektin als Plasmaexpander.**